

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/18185 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 9/12, C07K 14/555

(21) International Application Number: PCT/US00/24657

(22) International Filing Date:
8 September 2000 (08.09.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/152,854 8 September 1999 (08.09.1999) US

(71) Applicant: GENETROL BIOTHERAPEUTICS, INC.
[US/US]; Suite 201, 2220 Livingston Street, Oakland, CA 94606 (US).

(72) Inventors: LAU, Allan, S.; 39 Rosewood Drive, San Francisco, CA 94127 (US). BROWNING, Laura; 925 Outrigger Circle, Brentwood, CA 94513 (US). KIEFER, Michael, C.; 401 Wright Court, Clayton, CA 94517 (US).

(74) Agents: MEI, Ivy, Y. et al.; Iota Pi Law Group, P.O. Box 60850, Palo Alto, CA 94306-0850 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- With international search report.
- Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: HIGH LEVEL CYTOKINE PRODUCTION WITH ENHANCED CELL VIABILITY

(57) Abstract: The present invention relates to methods for enhancing the production of cytokines in cell culture, particularly under conditions of PKR overproduction. The method is based on suppression of the apoptotic cell death process in cultured human cells in PKR-overproducing cells.

WO 01/18185 A1

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-509025

(P2003-509025A)

(43) 公表日 平成15年3月11日 (2003.3.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:91	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2001-522396 (P2001-522396)	(71) 出願人	ジーンコントロール バイオセラピューティクス, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成12年9月8日 (2000.9.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94606,
(85) 翻訳文提出日	平成14年3月7日 (2002.3.7)		オークランド, リビンストン ストリート 2220, スイート 201
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 2 4 6 5 7	(72) 発明者	ラウ, アラン エス.
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 1 8 1 8 5		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127,
(87) 国際公開日	平成13年3月15日 (2001.3.15)		サン フランシスコ, ローズウッド
(31) 優先権主張番号	6 0 / 1 5 2, 8 5 4		ドライブ 39
(32) 優先日	平成11年9月8日 (1999.9.8)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞生存能力が増強した高レベルサイトカイン産生

(57) 【要約】

本発明は、細胞培養におけるサイトカインの産生を増強するための方法に関するし、特に P K R 過剰産生条件下での細胞培養におけるサイトカインの産生を増強するための方法に関する。この方法は、P K R を過剰に産生する細胞において培養されるヒト細胞中のアポトーシス細胞死プロセスを抑制することに基づいている。本発明は、1つの局面において、ヒト細胞培養において選択された1つのサイトカインまたは複数のサイトカインを産生する方法を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト細胞培養においてサイトカインを産生するための方法であって、以下：

(a) (i) 第1のプロモーターの制御下で細胞アポトーシスを阻害するに有効なタンパク質をコードするDNAを含む、第1のベクターと(ii) 第2のプロモーターの制御下で二本鎖RNA依存性キナーゼ(PKR)をコードするDNAを含む第2のベクターとでトランスフェクトされた、サイトカインを産生し得るヒト細胞株を、該トランスフェクトされた細胞においてPKRが過剰産生される培養条件下で培養する工程であって、該過剰産生されることは、同じ培養条件下で増殖された場合に該第1のベクターと第2のベクターとでトランスフェクトされていないヒト細胞株にて得られるPKRのレベルよりも高い、該トランスフェクトされた細胞株におけるPKRのレベルにより示される、工程、

(b) 該培養されたPKR過剰産生ヒト細胞株を、二本鎖RNA(dsRNA)で処理する工程、ならびに

(c) 該培養された処理された細胞株により産生される1つ以上のサイトカインを収集する工程、
を包含する、方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記培養された細胞株が、サイトカインを産生し得るヒト細胞を前記第1のベクターと前記第2のベクターとで連続してトランスフェクトすることにより調製される、方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の方法であって、前記アポトーシスを阻害するに有効なタンパク質は、B細胞リンパ腫/白血病-2遺伝子(Bcl-2a)、B細胞リンパ腫/白血病-X_L(Bcl-X_L)、真核生物翻訳開始因子2 α (eIF-2 α)の改変形態、真核生物翻訳開始因子(eIF-3)、Fas関連デスドメイン(FADD)の改変形態、Bcl-X_sの改変形態、Bcl-2相同性アンタゴニスト/キラー(BAK)の改変体形態、およびBAXの改変形態からなる群より選択される、方法。

【請求項4】 請求項3に記載の方法であって、前記アポトーシスを阻害するに有効なタンパク質がBcl-2aまたはBcl-X_Lである、方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法であって、前記第1のプロモーターまたは第2のプロモーターが誘導性プロモーターである、方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法であって、前記誘導性プロモーターがメタロチオネインプロモーターである、方法。

【請求項7】 請求項1に記載の方法であって、前記産生されるサイトカインが、以下：

i) $IFN-\alpha$ 、 $IFN-\beta$ および $IFN-\gamma$ からなる群より選択される、インターフェロン；

ii) $TNF-\alpha$ 、 $TNF-\beta$ および TNF 可溶性レセプター ($sTNF-R$) からなる群より選択される、腫瘍壊死因子 (TNF) ；

iii) $IL-2$ 、 $IL-3$ 、 $IL-4$ 、 $IL-5$ 、 $IL-6$ 、 $IL-7$ 、 $IL-8$ 、 $IL-11$ および $IL-12$ からなる群より選択される、インターロイキン (IL) ；

iv) 顆粒球コロニー刺激因子 ($GM-CSF$) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ($G-CSF$) からなる群より選択される、コロニー刺激因子；

v) 繊維芽細胞増殖因子 (FGF)、血管内皮増殖因子 ($VEGF$)、血小板由来増殖因子1および血小板由来増殖因子2 ($PDGF1$ および $PDGF2$) からなる群より選択される、血管形成因子；

vi) $RANTES$ 、 $MIP-1\alpha$ および $MIP-2\alpha$ を含むマクロファージ炎症性タンパク質 (MIP)、ならびに単球遊走タンパク質-1 (MCP) からなる群より選択される、ケモカイン；

vii) アンギオスタチンおよびエンドスタチンからなる群より選択される、抗血管形成因子；

viii) 白血病阻害因子 (LIF) ；

ix) 毛様体神経栄養因子およびカルディオトロフィン；ならびに

x) オンコスタチンMを含む、オンコスタチン、

からなる群より選択される、方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、前記培養されたヒト細胞株

が、繊維芽細胞もしくは免疫細胞、B細胞、T細胞、単球、好中球、ナチュラルキラー細胞、前単球U937細胞、Namalwa細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、Flow 1000細胞、Flow 4000細胞、FS-4、FS-7細胞、MG-63細胞、CCRF-SB細胞、CCRF-CEM、Jurkat細胞、WIL2細胞およびTHP-1細胞からなる群より選択される親細胞株に由来する、方法。

【請求項9】 PKR過剰産生の条件およびサイトカイン誘導の条件下でヒトサイトカイン産生細胞を培養することによりヒト細胞培養においてサイトカインを産生するための方法において、該細胞の生存能力を増加するための改良であって、該細胞株として、該細胞におけるアポトーシスを阻害するに有効なタンパク質をコードするDNAを含むベクターでトランスフェクトされた細胞を使用することを包含する、改良。

【請求項10】 請求項9に記載の改良であって、前記細胞株が、PKRを発現するDNAを含むベクターでもトランスフェクトされる、改良。

【請求項11】 請求項9に記載の改良であって、前記細胞におけるアポトーシスを阻害するに有効なタンパク質をコードするDNAが、前記トランスフェクトされた細胞株の細胞により該タンパク質の発現を生じるに有効な条件下で第2のプロモーターに作動可能に連結された、Bcl-2、Bcl-X_L、真核生物翻訳開始因子2 α (eIF-2 α)の改変形態、真核生物翻訳開始因子(eIF-3)、Fas関連デスドメイン(FADD)の改変形態、Bcl-X_sの改変形態、BAKの改変体形態、およびBAXの改変形態からなる群より選択されるタンパク質をコードする、改良。

【請求項12】 請求項11に記載の方法であって、前記アポトーシスを阻害するに有効なタンパク質が、Bcl-2aまたはBcl-X_Lである、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、特にPKR過剰発現の条件下で、サイトカイン合成に関連したアポトーシスを阻害することにより細胞培養におけるサイトカインの産生を増強する方法に関する。

【0002】

【表1】

参考文献

- Abbas, AK, *et al.*, Eds., CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 3rd edition, WB Saunders Co., 256-257, 1997).
- Antonelli, G., *J Interferon Cytokine Res* (17)Suppl 1:S39-S46, (1997).
- Antonelli, *et al.*, *J. Inf. Disease* 163:882-885 (1991).
- Ausubel, FM, *et al.*, in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley and Sons, Inc., Media, PA (1992).
- Baker, S.J., *et al.*, *Science* 249(4971):912-5, (1990).
- Balachandran, S., *et al.*, *EMBO J.* 17:6888-6902, (1998).
- Balkwill FR and Burke F, *Immunology Today*, 10(9):299, (1989).
- Boise, Thompson. *Current Topics Microbiol Immunol* 200:107-121, (1995).
- Chinnaiyen, D., *et al.*, *Cell* 81:505-512, (1995).
- Chong KL *et al.*, *EMBO J.* 11(4):1553-62 (1992).
- Clemens MJ and Bommer UA, *Int J Biochem Cell Biol*, 31(1):1-23, (1999).
- Clemens MJ and Elia A, *J Interferon Cytokine Res*, 17(9):503-24, (1997).
- Clark S and Kamen R, *Science*, 236:1229-1237, (1987).
- Cohen, J.J., *Immunol Today* 14(3):126-130, (1993).
- Cohen, J.J., *et al.*, *Annu Rev Immunol* 10:267-293, (1992).
- Der, D., and Lau, A.S., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:8841-8845, (1995).
- Deutscher, METHODS IN ENZYMOLOGY, 182, 1990; Scopes, PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, Springer-Verlag, New York (1982).
- Donze, O., *et al.*, *Virol* 256:322-329, (1999).
- Dressler, K.A., *et al.*, *Science* 255:1715-1718, (1992).
- Feng GS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5447-51 (1992).
- Galabru, J., and Hovanessian, A., *J. Biol. Chem.* 262:15538-15544 (1987).
- Garcia, I., *et al.*, *Science* 258:302-304, (1992).
- Guy, G.R., *et al.*, *J Biol Chem* 267(3):1846-1852, (1992).
- Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Pubs., N.Y. (1988).
- Heller, R.A., *et al.*, *Cell* 70(1):47-56, (1992).
- Hershey, J.W.B., *Ann. Rev. Biochem.* 60:717-755, (1991).
- Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6: 1204-1210, 1988.
- Huang *et al.*, *Oncogene* 14: 405-414, 1997.
- Kane, D.J., *et al.*, *Science* 262:1274-1277, (1993).
- Korsmeyer, S.J., *Blood* 80(4):879-886, (1992).

(表1aの続き)

- Koromilas *et al.*, *Science* 257:1685, 1992.
- Kosik, K.S., *Science* 256:780-783, (1992).
- Kumar, A., *et al Proc Natl Acad Sci USA* 91:6288-6292, (1994).
- Larrick, J.W., and Wright, S.C., *FASEB J* 4:3215-3223, (1990).
- Lau, A.S., *et al., Pediat Infect Dis J, CME Review* 15:563-575, (1996).
- Levine, A.J., *Annu Rev Biochem* 62:623-651, (1993).
- Liddil, J.D., *et al., Cancer Res* 49:2722-2728, (1989).
- Meurs EF *et al.*, *J Virol.* 66(10):5804-14 (1992).
- Meurs, E., and Hovanessian, A.G., *Cell* 62:379-390, (1990).
- Nagata, S., and Suda, T., *Immunol Today* 16(1):39-43, (1995).
- Obeid, L.M., *et al., Science* 259:1769-1771, (1993).
- Oehm, A., *et al., J Biol Chem* 267(15):10709-10715, (1992).
- Orrenius, S., *J Intern Med* 237:529-536, (1995).
- Reed, J., *et al., Nature* 336:259-261, (1988).
- Reed, J., *et al., Exp Cell Research* 195:277-283, (1991).
- Rubin, B.Y., *et al., Cancer Res* 48:6006-6010, (1988).
- Sambrook J, *et al.*, in *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989).
- Schendel, *Cell Death Differentiation* 5(5):372-380, (1998).
- Schulze-Osthoff, K., *et al., Eur J Biochem* 254:439-459, (1998).
- Sen, G.C., and Lengyel, P., *J Biol Chem* 267:5017-5020, (1992).
- Stellar, H., *Science* 267:1445-1449, (1995).
- Srivastave, S., *et al., J Biol Chem* 273:2416-2423, (1998).
- Taylor, J.L., and Grossberg, S.E., *Virus Research* 15:126, (1990).
- Thompson, C.B., *Science* 267:1456-1462, (1995).
- Tracey, K.J., and Cerami, A., *Annu Rev Cell Biol.* 9:317-343, (1993).
- Van Lint, J., *et al., J Biol Chem* 267(36):25916-25921, (1992).
- Vaux, D.L., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:786-789, (1993).
- Williams, B.R.G., *Eur J Biochem.* 200:111, (1991).
- Williams, B.R.G., *Seminars in Oncology* 24(S9):70-77, (1997).
- Wong G and Clark S, *Immunology Today*, 9(5):137, 1988.
- Yeh, *et al., Science* 279:1954-1958, (1998).
- Yeung, M.C., *et al., Proc Natl Acad Sci USA* 93:12451-12455, (1996).
- Yeung, M., and Lau, A.S., *J Biol Chem* 273:25198-25202, (1998).
- Yeung, M., *et al., AIDS* 12:349-354, (1998).
- Yonehara, S., *et al., J Exp Med* 169(5):1747-1756, (1989).
- Zamanian-Daryoush M, *et al., Oncogene* 14(2):315-26, (1999).

(発明の背景)

ウイルス、細菌、および寄生虫を含む病原菌による感染は宿主免疫系の活性化を生じ、そして、種々の分子(例えば、サイトカイン)によるシグナル伝達は、免

疫系の多数の部門の動員を生じる。サイトカインは、局所のおよび／または全身的細胞間調節因子として作用する強力な多面性ポリペプチドの迅速に増大するコレクションであった（例えば、BalkwillおよびBurke, 1989; WongおよびClark, 1988; ならびにClarkおよびKamen, 1987を参照のこと）。これらは、多数の生物学的プロセス（例えば、免疫、炎症、および造血）において重要な役割を果たし、そして、線維芽細胞、内皮細胞、マクロファージ／単球、およびリンパ球を含む多様な細胞型によって産生される。最近まで、大多数のサイトカイン（インターフェロン（IFN）、腫瘍壊死因子（TNF）、インターロイキン（IL）、増殖因子（例えば、表皮増殖因子）および分化（differentiating）因子〔例えば、コロニー刺激因子（CSF）〕を含む）が同定されてきた。薬学的および工業的適用の両方を有する多数の他のタンパク質が、細胞培養によって産生されてきた。

一般的に、サイトカインおよび他のタンパク質は、細胞培養由来の天然のタンパク質を精製することか、または、昆虫細胞、微生物細胞もしくはヒト細胞でタンパク質を組換え的に産生することのいずれかによって産生される。天然のサイトカインおよび他のタンパク質は、これらが所定のサイトカインまたはタンパク質の天然の形態の十分なレパートリーを含み、そして、適切な構造を有することが公知であるという点で好ましいが、産生するのに費用がかかりそして時間を浪費する。

組換え的に産生されたサイトカインおよび他のタンパク質は、作製するのにより高価ではないが、外来の抗原を含み得る供給源に依存し、これらが投与される被験体による免疫応答を生じるか、または、天然の形態（すなわち、グリコシル化パターン）からの構造的バリエーションに起因して、より活性でないかもしれない。

従って、産生するのにこれらをより高価でなくするために、天然のサイトカインおよび他のタンパク質の産生を増強する方法が、有利である。

本方法は、微生物系（これは、タンパク質の天然の折り畳みのための適切なグリコシル化が可能とし得ない）においてか、または、低い産生レベルであるヒト細胞において、これらの因子の発現を利用する。

サイトカインの1つの例示的な群であるインターフェロンが、ウイルス感染または腫瘍細胞の増殖に応答して産生される。これらの糖タンパク質は、それらの抗ウイルス効果に加えて、抗腫瘍活性および免疫調節活性を有する。1994年以来、IFNは、米国における特定の臨床上の指標のためのFDAの承認を受けてきた。最近、IFN- β の2つの調製物（一方はE. coliにおいて、そして、他方は、チャイニーズハムスター卵巣細胞において産生された）は、多数の硬化症を有する患者のために承認されてきた。前者の産物は、抗IFN抗体を誘導することが公知であり、従って、インターフェロン免疫複合体を形成する。それはまた、多数の患者における注射部位組織壊死を含む所望でない効果の原因となる。さらなる欠損は、細菌によって産生されたIFNに起因しており、おそらくグリコシル化の欠如に起因して、抗体の誘導を含み；そして、種々の疾患におけるIFN- α の制限された効率は、部分的に組換え体処方物における他のサブタイプの欠失に起因し得る。以前の研究は、抗体形成によって反映されるような拒絶の発生率は、天然のIFN- α についての1.2%のみと比較して、細菌によって産生されたIFNについて20から38%も高くありえる（Antonelliら、1991；Antonelliら、1997）。

二本鎖RNA活性化プロテインキナーゼ（PKR）は、P1/e1F2キナーゼについていい、二本鎖RNA活性化インヒビターとしてのDAIまたはdsI、およびp68（ヒト）またはp65（マウス）キナーゼは、その酵素活性が、内部二本鎖RNA構造を示す二本鎖RNAまたは一本鎖RNAへの結合および結果としての自己リン酸化を必要とする、セリン/トレオニンキナーゼである（GalabruおよびHovanesian、1987；Meuraら、1990）。PKRは、WO97/08324において記載されるように（本明細書中に参考として明確に援用される）、インターフェロンを含む多数の有用なサイトカインの発現において、重要な役割を果たす。

PKRに起因する活性は、（1）IFN- α およびIFN- β の抗ウイルス活性および抗増殖性活性の媒介、（2）生理学的ストレスに対する未感染細胞の応答、ならびに（3）細胞増殖制御における役割を含む（ClemensおよびElia、1997；ZamarianおよびDaryoushら、1999）。

P K Rについての最も特徴付けられたインビボ基質は、真核生物開始因子-2 (e I F-2 a) の α サブユニットであり、これは、一旦リン酸化されると、細胞およびウイルスタンパク質合成の阻害を最終的に生じる (H e r s h e y, J. W. B., 1991)。P K Rは、二本鎖RNAによって活性化される場合、インビトロで開始因子e I F-2 aをリン酸化することが実証されてきた (C h o n g ら、1992)。

P K Rは、腫瘍抑制剤およびアポトーシスの誘導剤として機能し得ることがまた示唆されてきた (例えば、C l e m e n s および B o m m e r, 1999; K o r o m i l a s ら、1992を参照のこと)。最近の結果は、おそらくF a s レセプターの上流制御を介して、P K Rの活性形態の発現が、アポトーシスを引き起こすことを示す (D o n z e, O. ら、1999) (例えばまた、Y e u n g, M. C. ら、1996; Y e u n g, M. および L a u, A. S., 1998を参照のこと)。

このような培養における細胞によるサイトカインおよび他のタンパク質の産生を延長し、それによって増強させるための方法として、培養細胞株におけるアポトーシス細胞死を阻害することが所望である。

(発明の要旨)

本発明は、1つの局面において、ヒト細胞培養において選択されたサイトカイン (単数または複数) を産生する方法を含む。この方法は、サイトカインを産生可能であって、第1のプロモーターの制御下で細胞アポトーシスを抑制するに有効なタンパク質をコードするDNAを含む第1のベクターと、第2のプロモーターの制御下で二本鎖RNA依存キナーゼ (P K R) をコードするDNAを含む第二のベクターとでトランスフェクトされているヒト細胞株を培養する工程を包含する。この細胞は、P K Rがトランスフェクトされた細胞株において過剰産生される条件下で、培養され、この過剰産生は、同一の培養条件下で増殖された場合に第1および第2のベクターでトランスフェクトされていないヒト細胞株において得られるレベルよりもより高い、トランスフェクトされた細胞株におけるP K Rのレベルによって示される。P K R過剰産生細胞は、サイトカインを誘導するように処理され得 (例えば、細胞を二本鎖RNA (d s RNA) に暴露することに

よって)、そして、培養された処理された細胞株によって産生されたサイトカインは収集される。

培養された細胞は、好ましくは、第1のベクターおよび第2のベクターを連続的に使用してサイトカインを産生し得るヒト細胞をトランスフェクトすることによって調製される。アポトーシスを阻害するために有効なタンパク質は、例えば、Bcl-2a、Bcl-X_L、真核生物翻訳開始因子2 α (eIF-2 α)の改変形態および真核生物翻訳開始因子(eIF-3)、Fas関連デスドメイン(FADD)の改変形態、Bcl-X_sの改変形態、Bcl-2-相同性アンタゴニスト/キラー(BAK)の改変形態およびBAXの改変形態、好ましくは、Bcl-2またはBcl-X_Lであり得る。

【0003】

第1および/または第2のプロモーターは、誘導性であり得る(例えば、メタロチオネインプロモーター)。産生されるサイトカインは、以下の1つ以上であり得る:インターフェロン(IFN- γ 、IFN- α およびIFN- β を含む);腫瘍壊死因子(TNF)(TNF- α 、TNF- β およびTNF可溶性レセプター(sTNF-R)を含む);インターロイキン(IL)(IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11およびIL-12を含む);コロニー刺激因子(顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含む);血管形成因子(繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子1および血小板由来増殖因子2(PDGF1およびPDGF2)を含む);ケモカイン(RANTES (Regulated Upon Activation Normally T-Expressed Secreted));MIP-1 α およびMIP-2 α などのマクロファージ炎症性タンパク質(MIP)、単球遊走タンパク質(monocyte chemoattractive protein)-1(MCP)を含む);アンギオスタチン(angiotatin)およびエンドスタチンを含む、抗血管形成因子;白血病阻害因子(LIF);毛様体神経栄養因子;カルディオトロフィン(cardiotrophin)およびオンコスタチンMを含む、オンコスタチン。

【0004】

ヒト細胞株は、例えば、繊維芽細胞もしくは免疫細胞、B細胞、T細胞、単球、好中球、ナチュラルキラー細胞、前単球U937細胞、Namalwa細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、Flow 1000細胞、Flow 4000細胞、FS-4、FS-7細胞、MG-63細胞、CCRF-SB細胞、CCRF-CEM、Jurkat細胞、WIL2細胞およびTHP-1細胞に由来する。

【0005】

別の局面において、本発明は、PKR過剰産生の条件およびサイトカイン誘導の条件下でヒトサイトカイン産生細胞を培養することによりヒト細胞培養においてサイトカインを産生するための方法における改良を含む。この改良は、細胞におけるアポトーシスを阻害するに有効なタンパク質をコードするDNAを含むベクターでトランスフェクトされた細胞を細胞株として使用することによる細胞の生存能力を増大することを含む。

【0006】

好ましい細胞株は、PKRを発現するDNAを含むベクターでトランスフェクトされた細胞株である。細胞におけるアポトーシスを阻害するに有効なタンパク質をコードするDNAは、例えば、Bcl-2、Bcl-X_L、真核生物翻訳開始因子2 α (eIF-2 α)の改変形態、真核生物翻訳開始因子(eIF-3)、Fas関連デスドメイン(FADD)の改変形態、Bcl-X_sの改変形態、BAKの改変形態、およびBAXの改変形態、好ましくは、Bcl-2またはBcl-Xをコードする。

【0007】

本発明のこれらの目的および他の目的ならびにこれらの特徴および他の特徴は、発明の以下の詳細な説明が添付された図面と共に理解される場合、より十分に明らかとなる。

【0008】

(発明の詳細な説明)

(1. 定義)

用語「ベクター」は、新規な核酸を同化し、そして適切な宿主でこれらの新規な配列を増殖し得るヌクレオチド配列をいう。ベクターとしては、組換えプラスミドおよびウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の核酸を含むベクター（例えば、プラスミドまたは組換えウイルス）は、キャリア（例えば、タンパク質に複合体化されたプラスミド、脂質ベースの核酸形質導入系で複合体化されたプラスミド、または他の非ウイルスキャリア系）に存在し得る。

【0009】

クローニングベクターまたは発現ベクターは、さらなるエレメントを含み得（例えば、この発現ベクターは、2つの複製系を有し得る）、従って、これにより、2つの生物（例えば、発現のためのヒト細胞または昆虫細胞、およびクローニングおよび増幅のための原核細胞）において維持され得る。

【0010】

クローニングベクターおよび発現ベクターの両方は、このベクターが1以上の選択された宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスについて周知である。さらに、発現ベクターを組み込むために、この発現ベクターは、この宿主細胞ゲノムに対して少なくとも1つの配列相同性を含み、そして好ましくは、発現構築物に隣接する2つの相同性配列を含む。この組み込みベクターは、ベクターに挿入するために適切な相同性配列を選択することによって宿主細胞の特定の遺伝子座に指向され得る。ベクターを組み込むための構築物は、当該分野で周知である。

【0011】

クローニングベクターおよび発現ベクターは、代表的に選択可能な標識を含む。代表的な選択可能な標識遺伝子は、（a）抗体または他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリン）に対する耐性を与えるか、（b）栄養要求性欠乏を相補するか、または（c）複合培地から利用可能でない重要な栄養素を提供する（例えば、Bacilli由来のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）、タンパク質をコードする。

【0012】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物の作動可能に連結されたコード配列の発

現に必要なDNA配列をいう。例えば、原核生物に適切である制御配列は、プロモーター、必要に応じてオペレータ配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【0013】

核酸コード配列は、別の核酸配列と機能的な関係で配置することで「作動可能に連結」されなければならない。例えば、プレ配列リーダーまたは分泌リーダーに対応するDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、そのポリペプチドについてのDNAに作動可能に連結され；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結され；またはリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置される場合、コード配列に作動可能に連結される。一般に、「作動可能に連結された」DNA配列は、連続的であり、そして分泌リーダーの場合、連続的でありかつインフレームである。しかし、エンハンサーは、連続的である必要はない。結合は、都合の良い制限部位においてライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実施に従って使用される。

【0014】

プロモーター配列は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターのいずれかをコードする。このプロモーターは、天然に存在するプロモーター、遺伝子操作されたプロモーターまたはハイブリッドプロモーターのいずれかであり得る。

【0015】

本明細書中で使用される場合、用語「PKR発現」は、PKR遺伝子の転写および翻訳をいう。その産物は、前駆体RNA、mRNA、ポリペプチド、翻訳後プロセッシングポリペプチド、およびそれらの誘導体を包含し、そして他の種（例えば、マウスまたはサル酵素）由来のPKRを包含する。例示のために、PKR発現のためのアッセイは、自己リン酸化アッセイ、eIF2 α リン酸化のためのアッセイ、ウェスタンブロット分析およびノーザンブロット分析およびPKR mRNAのための逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を包含する

。

【0016】

本明細書中で使用される場合、用語「PKRの生物学的活性」および「生物学的に活性なPKR」とは、PKR、PKRの任意のフラグメント、誘導体、またはアナログと関連した任意の生物学的活性（例えば、酵素活性（特に、自己リン酸化活性および真核生物翻訳開始因子（eIF-2）リン酸化活性を含む））をいう。

【0017】

本明細書中で使用される場合、用語「正常レベルのPKR活性」および「正常レベルのPKR発現」とは、刺激されていないかまたは感染していない特定のタイプの細胞（例えば、特定の細胞株）に存在することが決定されたPKR活性または発現のレベルをいう。このような「正常な」PKR活性または発現は、PKRをコードするベクターでトランスフェクトされておらず、刺激されておらず（誘導または感作されない）そして感染していない、所定のタイプの細胞について一般に観察されるPKR活性または発現の範囲であるとして報告されることが理解される。

【0018】

「正常」PKR活性または発現の範囲は、培養条件にいくらか依存して変動し得る。例えば、U937細胞株は、Ver oまたはN a m a l w a細胞株について正常範囲のPKR活性とは異なる正常範囲のPKR活性を有し得る。PKRの過剰発現は、PKRをコードするベクターでトランスフェクトされていない、刺激されておらず（誘導または感作されない）、そして感染していない所定のタイプの細胞について一般に観察されるPKR発現の正常範囲を上回る発現レベルを意味することになる。従って、PKRの「過剰発現」は、PKRをコードするベクターでトランスフェクトされていない、刺激されておらず（誘導または感作されない）、そして感染していない所定のタイプの細胞について一般に観察されるより大きなPKR活性または発現の範囲を意味する。

【0019】

同様の定義が、B c l-2、B C l-X_Lおよび関連のホモログに適用される

。ここで、Bcl-2またはBcl-X_Lの「過剰発現」は、それぞれ、Bcl-2またはBcl-X_Lをコードするベクターでトランスフェクトされていない、そしてアポトーシスを受けるように刺激されていない所定のタイプの細胞について一般に観察されるより大きいBcl-2またはBcl-X_Lの活性または発現の範囲を意味する。

【0020】

本明細書中で使用される場合、アポトーシスに関連したタンパク質（eIF-2 α またはeIF-2 α 、eIF-3、FADD、Bcl-X_s、BAK、BAXなど）に対する用語「～の改変形態」は、ネイティブタンパク質の誘導体または改変体の形態を意味する。すなわち、タンパク質「の改変形態」は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を含む誘導体ポリペプチド配列を有する。アミノ酸置換が特に好ましい。このアミノ酸置換、挿入、または欠失は、ポリペプチド配列内の任意の残基で生じ得る。これは、このタンパク質の生物学的活性に干渉しない。改変体または誘導体タンパク質をコードする対応する核酸配列は、遺伝子またはそれらのコード配列の「変異」または「改変」形態であるとみなされ、そして本発明の範囲内に含まれる。

【0021】

本明細書中で使用される場合、用語「生物学的活性」または「生物学的に活性な」は、そのネイティブ形態で、培養中の細胞株における特定のアポトーシス関連タンパク質が寄与する活性をいう。このようなタンパク質の「生物学的活性」は、培養条件にいくらか依存して変動し得、そして一般に、ある範囲の活性であるとして報告されることが理解される。従って、タンパク質の「生物学的に不活性な」形態は、天然で見出されるタンパク質の活性に干渉するように改変されたタンパク質の形態をいう。例えば、eIF-2 α の「生物学的に不活性な」形態は、改変されたリン酸化部位を有するタンパク質の形態であり得る。これは、タンパク質合成インヒビターとして作用せず、eIF-2 α のネイティブな「生物学的に活性な」形態と同様にはアポトーシスへの寄与を示さない。

【0022】

本明細書中で使用される場合、活性、発現、および産生に対して、用語「正常

レベルのサイトカイン」および「正常レベルのタンパク質」は、アポトーシスを阻害するのに有効な様式で処理されておらず、そしてPKR過剰発現を生じるのに有効な様式で形質転換されていない特定のタイプの細胞において存在することが決定されたサイトカインまたは他のタンパク質の活性、発現、または産生のレベルをいう。例としては、PKRまたはアポトーシスに関連したタンパク質をコードし、かつ所定のサイトカインまたは他のタンパク質を通常産生するか、または産生し得る導入遺伝子でトランスフェクトされていない細胞株が挙げられる。このような「正常な」サイトカインまたは他のタンパク質の活性、発現、または産生は、所定のタイプの細胞について一般に観察される活性、発現、または産生の範囲として報告され、そして培養条件にいくらか依存して変動し得ることが理解される。

【0023】

同様に、サイトカインに適用される定義はまた、本発明の方法によって産生される「他のタンパク質」にも当てはまる。

【0024】

例えば、PKRを過剰発現せず、そしてアポトーシスを阻害するのに有効な様式で処理されない所定の細胞株は、(1) PKRの過剰発現および(2) アポトーシス細胞死の阻害を生じる改変を伴う同じ細胞株についてのサイトカイン活性の範囲とは異なる、正常範囲のサイトカイン活性を有する。

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「アポトーシス細胞死」、「プログラムされた細胞死」および「アポトーシス」は、細胞分化の特定の段階で生じる、および特定の刺激に応じて生じる細胞事象の複雑なカスケードから生じる、またはこれに関連する任意の細胞死をいう。アポトーシス細胞死は、細胞を死亡させる細胞質および核の凝縮によって特徴付けられる。

【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「アポトーシス細胞死を阻害する」は、細胞株がサイトカインまたは他のタンパク質発現の目的で培養される期間にわたって細胞死プロセスを部分的にまたは完全に阻害することを意味する。このような

阻害は、一般的に、アポトーシス細胞死の量が、アポトーシスを阻害するのに有効な様式で改変されていない細胞株において観察されるアポトーシス細胞死の量に比較して、少なくとも20%、および好ましくは80%以上減少することを意味する。

【0027】

サイトカイン産生の場合、このような阻害は、一般に、アポトーシス細胞死の量が、アポトーシスを阻害するのに有効な様式で改変されていないPKR過剰発現細胞株において観察されるアポトーシス細胞死の量に比較して、少なくとも50%、および好ましくは80%以上減少することを意味する。

【0028】

(II. PKR)

IFNは、それらの同族レセプターへの結合、続いてIFN刺激遺伝子、ISGの誘導に至るシグナル伝達によってそれらの生物学的活性を惹起する。これらのISGは、細胞内で少なくとも以下の2つの経路によってIFNの生物学的活性を媒介する：特異的リボヌクレアーゼの活性化を介するRNAの分解、ならびにIFN調節および二本鎖RNA活性化キナーゼ(PKR)の誘導。

【0029】

ISGの例には、PKR（以前はp68キナーゼとして知られていた）、2'-5' 連結オリゴアデニレート(2-5A)シンセターゼ、およびMxタンパク質(TaylorおよびGrossberg、1990; Williams, 1991, 1997)が含まれる。2-5Aシンセターゼは、ATPを基質として使用して、2'-5' -ホスホジエステル結合により連結した12アデニレート残基までの短いオリゴマーを合成する。得られるオリゴアデニレート分子は、潜在するリボヌクレアーゼであるRNase Lを活性化し、これはウイルスおよび細胞性RNAを分解する。2-5Aシンセターゼ経路は、(1)IFN処理細胞から単離された細胞を含まないタンパク質合成システムにおいてウイルスタンパク質の合成における還元、および(2)腫瘍細胞の増殖の阻害にとって重要であるようである。

【0030】

PKRは、キナーゼ活性を有することが知られている唯一の同定されたdsRNA結合タンパク質である。PKRは、酵素活性がdsRNA結合およびその結果としての自己リン酸化を必要とするセリン/スレオニンキナーゼである (Meursら、1990; Feng GSら、1992)。

【0031】

種々の機能がPKRに寄与しており、それらには、真核生物開始因子2 (eIF-2 α) (これは一旦リン酸化されると、タンパク質合成の障害を導く) のリン酸化が含まれる (Hersheyら、1991)。このPKRの特定の機能は、IFN α およびIFN β の抗ウイルスおよび抗増殖活性を媒介することを担う機構の1つとして示唆されてきた。PKRについてのさらなる生物学的機能は、例えば、核因子 κ B (NF- κ B) の放出および活性化をもたらすI κ Bのcanリン酸化によるシグナル伝達因子としてのその推定的役割である (Kumar Aら、1994)。

【0032】

PKRがIFN発現の転写活性化を媒介することが以前に実証されている (Der DおよびLau AS, 1999)。この観察と一致して、PKRに対するアンチセンスでのU937細胞のトランスフェクトによる内因性PKR活性の抑制またはPKR不全変異体の発現は、ウイルス感染に対するIFNの誘導を減少させた (Der DおよびLau AS, 1995)。

【0033】

まとめると、PKRは、(1)複雑なレセプターシステムについてのシグナル伝達 (IFN, TNF、およびFasを含む)、(2)サイトカイン遺伝子の転写活性化、(3)アポトーシスの開始、および(4)eIF-2 α をリン酸化することによるタンパク質合成の障害と関連されてきた。

【0034】

本発明に従って、細胞生存能力が、サイトカイン産生細胞株として、適切なプロモーターの制御下で、その細胞においてアポトーシスを阻害し得るタンパク質をコードする遺伝子でトランスフェクトした細胞を利用して、PKRを過剰発現する条件下でサイトカインを産生する細胞において増大したことが見出されてい

る。そのプロモーターは、構成的プロモーターであるか、または適切なインデューサー(例えば、特定の金属塩の添加によってアップレギュレートされ得るメタロチオネインプロモーター)の培養培地に添加することによって誘導可能であるものであり得る。P K R 過剰発現は、本発明の好ましい実施形態において、P K R をコードする遺伝子でまたトランスフェクトされている細胞を使用して、また培養中でのP K R 過剰発現のための適切なプロモーター(構成的かまたは誘導性のいずれか)の制御下で、達成される。

【0035】

本明細書中の実施例1および2は、本発明における使用のために適切な細胞を得るための例示的なベクターおよびトランスフェクション方法を記載する。代表的には、その細胞は、まず抗アポトーシス遺伝子を含有するベクターでトランスフェクトされ、次いで、首尾良い形質転換体がさらに、P K R 遺伝子を含有するベクターでトランスフェクトされる。これにより、第2のトランスフェクションおよび抗アポトーシス機能によりすでに「安定化された」細胞で行われるべく選択が可能となる。このベクター構築物およびトランスフェクション条件は、従来のものであり、そして当業者に公知である。特に、このようなベクター構築物において、例えば、商業的な供給源から、選択されたヒト細胞へ導入されそしてそこで複製可能な、適切なプラスミドまたはその他のベクターを得ることは周知である。そのヒト細胞においてそのプラスミドはまた、選択マーカー、挿入部位、および適切な制御エレメント(例えば、終結配列)で装備され得る。そのプラスミドは、それ自身のプロモーターを有してもよいし、有しなくてもよい。有しない場合、このベクター構築物は、適切なプロモーター(広範に入手可能であり、そして例えば、コード配列のGenBankデータベースから入手し得る配列)の挿入を必要とする。P K R 遺伝子、およびBcl-X_L遺伝子のための代表的なコード配列は、実施例1において参照され、そして引用したようにGenBankから入手され得る。発現産物がアポトーシスを阻害することが公知である種々の遺伝子が、利用され得、そして以下に示される。そのプロモーターおよびコード配列は、周知の組換え技術に従って、適切なベクターに挿入される。

【0036】

(III. アポトーシス)

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、細胞固有の自殺プロセスである (Orrenius 1995; Stellar 1995; Vaux 1993)。アポトーシスは、生物に対して、胎児発生の間 (Cohen 1992)、器官の形成を制御する場合において (Nagata & Suda 1995; Vaux 1993)、および成体生活におけるホメオスタシスの目的のための3つともに、多くの利点を提供する。一旦、アポトーシスに拘束されると、細胞は、タンパク質合成の新しいラウンドおよび種々の形態学的/生理学的変化 (細胞質濃縮、核クロマチン濃縮、膜泡状突起、およびその結果のDNA分解を含む) を実行し、特徴的なオリゴヌクレオソームラダーとして検出される (Levine AJ, 1993)。死ぬ細胞は、結局、膜結合アポトーシス体にフラグメント化し、これは、急速にマクロファージにより、または近隣の細胞により、貪食され、そして分解される。

【0037】

所望されないでかつ潜在的に危険な細胞 (ウイルス感染細胞、自己免疫疾患における自己反応性リンパ球、または悪性細胞を含む) を除去するための防御メカニズムとして、アポトーシスは役に立つ (Oehmら、1992; Yoneharaら、1989; Vaux, 1993)。アポトーシスは、変異原性化学物質、発癌物質、またはUV照射にしばしば曝される組織における癌細胞の発達の危険を最小にするための手段として関係している。

【0038】

アポトーシスと関連する形態学的形質転換事象と異なり、プログラムされた細胞死に関係する遺伝的性質およびメカニズムは、同様には理解されていない。

【0039】

悪性腫瘍に対するさらなる防御は、免疫系の活性に応答して産生される、TNF- α 、前炎症性サイトカインにより付与され、そしてこれは、形質転換された宿主細胞のアポトーシス死を誘発し得る (Heller, 1992, Yeung, 1996)。

【0040】

アポトーシスプロセスの解除が、疾患プロセスの病因に寄与し得る (Thompson, 1995)。癌、AIDS、虚血性発作、および神経変性疾患を含む疾患発生のための必須の役割を果たすことが考えられ、そして証拠が、細胞死および不適切な細胞死の両方の阻害が、宿主に対して有害であり得ることを示唆する。例えば、アルツハイマー疾患およびパーキンソン疾患を含む神経変性疾患は、神経の特定のサブタイプの早まった死と関連するが (Kosik KS, 1992)、一方細胞性アポトーシスの不適切な抑制または生来の欠損は、細胞の悪性の形質転換を生じ得る (Korsmeyer, 1992)。

【0041】

個々のプロトオンコジーンはまた、アポトーシスを実行する細胞においての発現における、およびこのプロセスに関する個々のプロトオンコジーンの調節の影響における、アポトーシスと関連している。関係するプロトオンコジーンの列挙としては、C. elegansにおける初期の研究において最初に同定された、ced-3、ced-4、ced-9およびIceのような他の遺伝子に加えて、c-myc、Fas (APO-1)、p53、およびBcl-2が挙げられる (Stellar, 1995; Cohen, 1993)。このタンパク質のコード配列は、例えば、GeneBankデータベースにおいて、見出され得る。

【0042】

(アポトーシスにおけるPKRおよびTNF- α の役割)

プロトタイプ炎症性 (proinflammatory) サイトカインとしてのTNFは、病原体排除、抗ウイルス活性、および腫瘍破壊のプロセスの間に、活性化された免疫細胞により産生される細胞傷害性タンパク質である。しかし、インビボでの高レベルのTNF- α は、TNF- α が、造血の代謝障害、消耗、および抑制を誘導するので、有害であり得る。細胞性レベルにおいて、TNF- α が、活性酸素の産生、リソソームの酵素の活性 (Larrickら、1990; Liddiら、1989)、およびDNAのフラグメント化を、エンドヌクレオチドレアーゼ活性の活性化により誘導し (Rubinら、1988)、アポトーシスを導く。

【0043】

TNF- α 関連アポトーシスの正確なメカニズムは、明らかではなく、そして種々のメカニズムが、提案されている（例えば、Dresslerら、1992；Obaidら、1993を参照のこと）。（i）TNF- α 処置が、PKRを含むいくつかのセリン/トレオニンタンパク質キナーゼの活性化を生じること；（ii）TNF- α およびPKRは、NF- κ Bに移動性をもたせること；（iii）PKRは、セリン/トレオニンタンパク質キナーゼであり、そして増殖を阻害すること；iv）PKRは、TNF- α シグナル経路における中枢的な役割を果たすこと、そしてv）腫瘍抑制遺伝子p53は、TNF- α 誘導アポトーシスプロセスにおいて役割を果たす（Guyら、1992；Van Lintら、1992、YeungおよびLauら、1996を参照のこと）ことが、示されている。

【0044】

（IV．細胞性因子の調節された発現）

本発明は、アポトーシス細胞死プロセスを抑制することにより、ヒト細胞培養におけるサイトカインの増強された産生のための方法を提供する。アポトーシスを阻害することにより、本明細書中に記載される細胞株は、培養においてより長い寿命を有し；結果として、サイトカインの生合成は、増加され、そして／または細胞が、サイトカインを産生するために機能する時間が、増加する。

【0045】

ヒト細胞培養におけるアポトーシス細胞死プロセスの抑制は、アポトーシスの阻害に関する多数のストラテジーのいずれかにより達成され、これは、以下を含み得る：（1）抗オンコジーン（例えば、Bcl-2（GenBank登録番号M14745）、Bcl-X_L（GenBank登録番号L20121）またはそのホモログ）の過剰発現（2）内因性FADD（GenBank登録番号NM00384）活性の抑制（例えば、FADDの変異形態の過剰発現、相同組換えまたは部位特異的変異誘発による内因性FADD遺伝子の変異）；（3）eIF2- α （GenBank登録番号A457497）リン酸化の抑制（例えば、相同組換えもしくは部位特異的変異誘発による内因性eIF2- α 遺伝子の変異により、eIF- α の変異形態を過剰発現させ、それによりPKRの下流物質

を阻害することによる) ; または (4) 相同組換えもしくは部位特異的変異誘発によるか、または BAX、BAK、および Bcl-Xs のうちの 1 つ以上の遺伝子変性もしくは遺伝子欠失による、Bcl-2 の 1 つ以上のプロアポトーシスカウンターパート (例えば、BAX (GenBank 登録番号 L22473)、BAK (GenBank 登録番号 BE221666)、および Bcl-Xs (GenBank 登録番号 L20122)) についての内因性遺伝子の変異による、トランスドミナント変異体の使用。

【0046】

細胞死は、ヨウ化プロピジウム (PI) を用いた細胞の染色により、またはアポトーシス細胞死に特異的なアッセイの使用により (例えば、アネキシン V を用いた染色)、検出され得る (Vermes ら、1995)。壊死性の細胞死は、細胞生存能力についてのアッセイと関連細胞の形態の顕微鏡観察との組み合わせの結果を評価することにより、アポトーシス細胞死と区別され得る。

【0047】

(アポトーシスの阻害)

1 つの局面において、本発明は、細胞死プロセスの部分的抑制または遅延を生じるのに有効な様式で、細胞培養内の細胞を改変することにより、同じ条件下でアポトーシス細胞死プロセスの抑制を有さない同じ細胞株の培養と比較して、サイトカインまたは他のタンパク質の産生の上記正常なレベルが達成されるような結果を生じる条件下で、特定の細胞株を培養することにより、サイトカインまたは他のタンパク質産生を調節するための方法を提供する。

【0048】

本発明は、さらに、サイトカインまたは他のタンパク質を産生する方法を提供し、該方法は、アポトーシスを阻害するのに有効である所望の遺伝子をコードする DNA 配列に作動可能に連結される、宿主細胞において機能するプロモーターを有する発現ベクターを用いて感染された宿主細胞を培養することを包含する。これらのタンパク質は、例えば、Bcl-2a、Bcl-XL、真核生物翻訳開始因子 2 α (eIF-2 α) または真核生物翻訳開始因子 (eIF-3) の改変形態 (GenBank 登録番号 BE221666)、Fas 関連デスドメイン (

FADD)の改変形態、Bcl-Xsの改変形態(GenBank登録番号L20121)、BAKの改変形態およびBAXの改変形態、好ましくは、Bcl1-2aまたはBcl-X_Lであり得る。この所望の遺伝子は、アポトーシス細胞死の抑制または遅延を生じる宿主細胞において、過剰発現される。内因性遺伝子の発現の抑制をもたらすさらなる手段が利用され得、これは、内因性遺伝子の変異(例えば、相同組換えまたは部位特異的変異誘発、遺伝子欠損または遺伝子切断により)を含むが、これらに限定されない。

【0049】

上述のように、これらの遺伝子を含む細胞は、代表的に、細胞中でPKRの過剰発現を達成するための、内因性PKR遺伝子を有するベクターもまた含む同時形質転換体である。本発明における使用のために適切なヒト細胞株としては、線維芽細胞または免疫細胞、B細胞、T細胞、単球、好中球、ナチュラルキラー細胞、前単球U937細胞、Namalwa細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、Flow 1000細胞、Flow 4000細胞、FS-4細胞、FS-7細胞、MG-63細胞、CCRF-SB細胞、CCRF-CEM細胞、Jurkat細胞、WIL2細胞およびTHP-1細胞が挙げられる。

【0050】

本発明のさらなる実施形態において、アポトーシスを阻害するよう処理された細胞は、所定のサイトカインまたは目的のタンパク質を発現するのに一般的に使用され、ここで、このタンパク質の発現はPKRとは関連しない細胞株(例えば、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞)を含む。

【0051】

(アポトーシス関連タンパク質の改変形態)

上記で示されるように、アポトーシスは、天然におけるアポトーシスプロセスを促進することと関連するタンパク質の改変形態または改変体形態を発現するのに有効な様式で細胞を改変することにより、天然におけるアポトーシスプロセスを促進することと関連するタンパク質の発現を減少させることにより、阻害され得る。あるいは、アポトーシスは、天然のアポトーシスプロセスをブロックすることと関連するタンパク質の発現を増大することにより、阻害され得る。

【0052】

好ましい実施形態において、改変eIF-2 α タンパク質、改変FADDタンパク質、改変Bcl-X_sタンパク質、改変BAKタンパク質および改変BAXタンパク質は、天然に見出されるようなそれぞれのタンパク質の誘導体または改変体のeIF-2 α 、FADD、Bcl-X_s、BAKおよびBAX形態である。つまり、誘導体ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失または挿入を含み、アミノ酸置換が好まれる。アミノ酸置換、挿入または欠失は、タンパク質の生物学的活性に干渉する限り、このポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列内の任意の残基で存在し得る。

【0053】

このようなネイティブなタンパク質のこれらの改変形態または改変体形態が、その改変体をコードするDNAを産生し、そしてその後、細胞培養において組換え形態のDNAを発現するために、カセット変異誘発またはPCR変異誘発または当該分野で周知の他の技術を使用して、eIF-2 α タンパク質、FADDタンパク質、Bcl-X_sタンパク質、BAKタンパク質およびBAXタンパク質をコードするDNAにおけるヌクレオチドの部位特異的変異誘発により通常調製される。

【0054】

部位特異的変異誘発は、所定のタンパク質をコードするDNAに1つ以上のヌクレオチド配列変化を導入するための手段を提供し、そして一般に、部位特異的変異誘発の技術は、当該分野で周知であり、そして代表的に、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用する。

【0055】

本明細書中に記載されるネイティブなタンパク質の全ての変異体、改変形態または改変体形態は、適切な核酸配列の点特異的変異誘発または部位特異的変異誘発により、または相同組換え（ノックインまたはノックアウト）により作製され、標的遺伝子またはそのタンパク質の機能または活性の阻害を達成し得る。

【0056】

一般に、eIF-2 α 、FADD、Bcl-X_s、BAKまたはBAXタンパ

ク質の改変形態をコードする酵母遺伝子およびヒト遺伝子の両方についてのcDNA配列は、強い構成的ウイルスプロモーター（CMVプロモーターまたはSV40プロモーター）の制御下で、発現ベクターに挿入される。他の場合、cDNA配列は、誘導性プロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）の制御下で、発現ベクターに挿入される。このような発現ベクターにおける使用のための選択マーカーは、一般的に、当該分野で公知である（例えば、neo（G418、ジェネティシン（geneticin））およびEcoGPT（ミコフェノール酸））。発現ベクターが、所定の細胞型において発現を促進するのに必要な成分をさらに含むことが理解され、そしてこのことは、一般に当該分野で公知である。

【0057】

細胞が、エレクトロポレーションおよびリン酸リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、リポフェクチンまたはリポフェクタミン処理を含む、標準的な手順を使用してトランスフェクトされ、そして適切な抗生物質において選択される。組換えDNA技術を使用して、ネイティブなタンパク質の改変形態のクローニングおよび発現の手順が、一般に、当該分野で公知であり、以下に記載される：Ausubelら、1992およびSambrookら、1989（特に、本明細書中に参考として援用される）。

【0058】

1つのアプローチにおいて、サイトカイン産生のための細胞が、eIF-2α、FADD、Bcl-Xs、BAKおよびBAXの改変形態を発現するために有効な核酸構築物または発現ベクター、ならびにPKRを過剰発現するに有効な発現ベクターを用いて、同時トランスフェクトされ得る。関連アプローチにおいて、PKR過剰発現株が、eIF-2α、FADD、Bcl-Xs、BAKまたはBAXの改変形態を発現するのに有効な核酸構築物または発現ベクターを用いてトランスフェクトされ得る。

【0059】

本発明の別の局面において、発現がPKRにより調節されないタンパク質の産生のための細胞が、eIF-2α、FADD、Bcl-Xs、BAKまたはBA

Xの改変形態を発現するために有効な核酸構築物または発現ベクターを用いてトランスフェクトされる。

【0060】

トランスフェクションおよび形質転換された細胞の選択後、この細胞は、以下にさらに記載されるように、目的のサイトカインまたは他のタンパク質（の産生を生じるのに有効な様式で、更に培養される。

【0061】

(eIF α リン酸化の抑制)

P.K.Rは、前単球U937細胞を含む細胞におけるTNF誘導アポトーシスおよびp53媒介アポトーシスにおいて、必須の役割を果たすことが示されている (Yeung, M. C. ら、1996; Yeung, M. および Lau, A. S., 1998)。U937細胞をP.K.RアンチセンスまたはP.K.R変異体発現プラスミドでトランスフェクトすることによる、P.K.R活性の抑制は、その細胞を、TNFまたはエンドトキシン誘導細胞傷害性に対してより抵抗性にする。eIF-2 α は、P.K.Rの生理学的物質であるので、P.K.Rによるそのリン酸化は、アポトーシスを誘導するために十分であることが示されている。

【0062】

一貫して、TNF誘導アポトーシスは、eIF-2の α サブユニットの増加したリン酸化と関連している (Srivastavaら、1998)。

【0063】

上記で示されるように、eIF-2 α は、リン酸化の後の細胞タンパク質合成およびウイルスタンパク質合成の阻害に寄与する。その結果として、eIF-2 α 因子のリン酸化部位を変異させることによる、eIF-2 α のP.K.R媒介リン酸化の抑制は、培養された細胞株のP.K.R過剰発現のアポトーシスの影響を阻害する手段を提供する。

【0064】

改変体eIF-2 α タンパク質が、eIF-2 α の改変形態のコード配列を含むベクターを使用して、リンパ系細胞において、発現された。

【0065】

酵母およびヒトの $eIF-2\alpha$ 遺伝子は、59位における単一のアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする改変されたDNA配列を使用して、変異され、セリン→アラニン改変体を生じた。59位は、PKRによりリン酸化されたリン光 (phosphoresce) 残基であることが以前に示されている。このアラニン改変体は、不活性でないが、PKRの効果に対して非感受性である。

【0066】

$eIF-2\alpha$ 発現プラスミドおよびPKR発現プラスミドの増幅が、PKRカセットと同じプラスミド上に含まれるDHFR発現カセットの存在下でのMTX選択を使用して達成された。これは、内因性DHFRより多くの増幅が可能なDHFR変異体の発現を生じ、これは、同時発現産物の選択的増加を可能にする。

【0067】

改変体 (変異された) $eIF-2\alpha$ cDNA配列が、上記のような強いウイルスプロモーターの制御下に、挿入されたフラグメントを発現するのに有効なベクターに挿入された。

【0068】

$eIF-2\alpha$ の改変形態を発現している細胞が、生成され、選択され、さらに、サイトカインまたは目的他のタンパク質の産生を生じるのに有効な様式で培養され、そして目的のサイトカインまたは他のタンパク質の生合成について分析された (以下に記載される)。

【0069】

(内因性FADD活性の抑制)

Fasレセプターは、TNFおよび神経成長因子レセプタースーパーファミリーのメンバーである (Stelliar, 19956)。FasレセプターへのFasリガンドの結合後、アポトーシスが、すぐ下流のエフェクター (FADD、FLICE、およびTRADDを含む) を介して、開始される。FADDは、CD95リガンドおよびTNF誘導アポトーシスに必須である、デスドメインを有する細胞質タンパク質である。

【0070】

これらのタンパク質のそれらのそれぞれのレセプターに対する結合は、カスパ

一ゼプロテアーゼカスケードの活性化を生じ、そしてアポトーシスを促進する。

Fas発現および結果として生じるアポトーシスは、NIH-3T3細胞におけるPKR活性により調節されることが以前に示されている(Donzeら、1999)。PKRキナーゼ活性が欠損したトランスドミナント(transdominant)ネガティブ変異体でトランスフェクトされた細胞において、Fas、TNFR-1、FADD(Fas関連デスドメイン)、FLICE、BadおよびBAXの発現が、抑制され、そして細胞が、アポトーシス誘導因子に耐性であった。さらに、FADDを欠くマウス線維芽細胞は、dsRNA媒介細胞死にほとんど耐性であった(Balachandranら、1998)。

【0071】

改変体である非機能性のヒトFADD遺伝子およびマウスFADD遺伝子が、野生型FADD遺伝子から生成された(Chinnaiyenら、1995; Yehら、1998)。変異遺伝子が、FADD活性が欠損しPKR媒介細胞傷害性に結果として抵抗性を有するマウスFADD-/-細胞を生成するために使用された(Balachandranら、1998)。Fas媒介細胞死プロセスが、改変されたFADD遺伝子を発現している細胞において阻害されるかまたは排除され、アポトーシスの阻害を可能にする。FADDのこのような生物学的不活性形態の阻害効果は、PKR活性により、回避されない。

【0072】

変異されたFADD cDNA配列が、上記のような強いウイルスプロモーターの制御下に、挿入されたフラグメントを発現するために有効なベクターに挿入された。

【0073】

FADDの改変形態を発現している細胞が、生成され、選択され、さらに、目的のサイトカインまたは他のタンパク質の産生を生じるのに有効な様式で培養され、そして目的のサイトカインまたは目的の他のタンパク質の生合成について分析された(以下に記載される)。

【0074】

(Bcl-2、Bcl-X_Lまたはそのホモログの過剰発現)

遺伝子産物のBcl-2ファミリーが、多様な生物学的系において以前に研究されているアポトーシスプロセスに一般的に関係する。Bcl-2およびBcl-X_Lは、抗アポトーシスタンパク質であると考えられ(BoiseおよびThompson, 1995; Schendel, 1998)そしてリンパ性細胞および骨髓性細胞に関する以前の研究が、細胞増殖の維持および細胞死の予防におけるBcl-2aの役割を示している(Cohen, 1993)。さらに、Bcl-2aは、神経細胞アポトーシスの予防において有意な役割を果たし(Garciaら, 1992)、おそらく、反応性酸素種の生成を減少させることによる(Kaneら, 1993)。

【0075】

多くの細胞の生存能力は、サイトカインまたは増殖因子の一定の供給または断続的な供給に依存する。このようなサイトカインまたは増殖因子の非存在下で、細胞は、アポトーシスを行う。タンパク質のBcl-2ファミリーは、サイトカインにより媒介されるアポトーシスプロセスに不可欠である。Bcl-2およびBcl-X_Lの過剰発現は、サイトカインが除かれた場合に、アポトーシスを抑制することが示されている。BAXおよびBAKの過剰発現が、サイトカインレセプターから入ってくるシグナルを無視し、そしてアポトーシスを誘導することが示されている。

【0076】

本発明の例示的適用において、Bcl-2過剰発現細胞が、pSV-2-Bcl2発現プラスミドを標的細胞に感染させることにより産生された(Reedら、1988; Reedら、1981)。

【0077】

Bcl-2過剰発現細胞およびBcl-X_L過剰発現細胞が、生成され、選択され、目的のサイトカインまたは他のタンパク質の産生を生じるのに有効な様式でさらに培養され、そして以下に記載されるように、目的のサイトカインまたは他のタンパク質の生合成について分析される。

【0078】

(Bcl-2のプロアポトーシスカウンターパートの阻害)

一般に、BAX、BAK、Bcl-Xsなどは、プロアポトーシスタンパク質である(BoiseおよびThompson、1998)。上記で示されるように、BAX、BAK、Bcl-Xsの過剰発現が、細胞生存能力と関連するサイトカイン媒介シグナルから入ってくるシグナルを無視し、そしてアポトーシスを誘導することが示されている。

【0079】

従って、改変体である非機能性のヒトBAX遺伝子、BAK遺伝子、Bcl-Xs遺伝子が、野生型のBAX遺伝子、BAK遺伝子、Bcl-Xs遺伝子から生成され得る。このような変異遺伝子が、それぞれ、BAX、BAK、またはBcl-Xs活性が欠損した形質転換細胞を生成するために使用され、アポトーシスの阻害を可能にする。アポトーシスにおける、BAX、BAK、Bcl-Xsのこのような生物学的不活性形態の阻害効果は、培養された細胞株中のアポトーシス細胞死に関するPKR過剰発現の刺激効果を蓄積するための手段を提供する。

【0080】

変異されたかまたは改変体のヒトBAX、BAK、Bcl-Xs cDNA配列が、上記のような、強いウイルスプロモーターの制御下に、挿入されたフラグメントを発現するのに有効なベクターに挿入され得る。

【0081】

ヒトBAX、BAK、またはBcl-Xsの改変形態を発現している細胞が、これにより生成され、選択され、目的のサイトカインまたは他のタンパク質の産生を生じるのに有効な様式で、さらに培養され、次いで、目的のサイトカインまたは他のタンパク質の生合成についてさらに分析される(以下に記載される)。

【0082】

(V. サイトカイン)

サイトカインは、それらの同族レセプターに結合することにより、生物学的活性を惹起し、その後にシグナル伝達が、種々の生化学的プロセスの刺激を導く。いくつかの場合、このようなレセプターの発現が、特異的なシグナルにより調節され、例えば、サイトカインが、ポジティブまたはネガティブなフィードバックループに関係し得、そしてそれにより、同じかまたは異なるサイトカインに関す

るレセプターの発現を調節し得る。このようなレセプターは、このサイトカインを産生する同じ型の細胞または異なる型の細胞であり得る。

【0083】

サイトカインは、免疫応答および炎症応答を媒介および調節するために機能する。一般に、サイトカイン産生は一過性であり、そして産生は、mRNA転写物の産生を生じる転写の短い期間に起こる。このmRNA転写物はまた、短く存続し、そして転写後制御機構に支配される。細菌の研究は、一般的なシグナル伝達経路（「J a k / S T A T」経路）が、種々のサイトカインにより使用されることを示している（A b b a sら、1997）。

【0084】

サイトカインの細胞供給源は、細胞の複数の多様な型により産生され得る各個々のサイトカインの区別する特徴であることが、理解される。さらに、所定のサイトカインは、（1）一つ以上の細胞の型に対して作用し得、（2）同じ細胞に対して1つより多くの効果を有し得、（3）別のサイトカインと共有される活性を有し得、そして（4）他のサイトカインの合成または効果に、例えば、その効果と拮抗するかまたはその効果と共同することにより、影響し得る。

【0085】

産生されるサイトカインは、以下のうちの1つ以上であり得る：インターフェロン（I F N- γ 、I F N- α およびI F N- β を含む）；腫瘍壊死因子（T N F）（T N F- α 、T N F- β およびT N F可溶性レセプター（s T N F-R）を含む）；インターロイキン（I L）（I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-11およびI L-12を含む）；コロニー刺激因子（顆粒球コロニー刺激因子（G-C S F）および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M-C S F）；血管形成因子（線維芽細胞増殖因子（E G F）、血管内皮増殖因子（V F G F）を含む）；血小板由来増殖因子1および血小板由来増殖因子2（P D G F 1および2）；ケモカイン（R A N T E S（R e g u l a t e d u p o n A c t i v a t i o n N o r m a l l y T-E x p r e s s e d S e c r e t e d）を含む）；マクロファージ炎症タンパク質（M I P）（例えば、M I P-1 α およびM I P-2 α ）；単球遊走（

chemoattractic) タンパク質-1 (MCP) ; 抗血管形成因子 (アンギオスタチンを含む) ; エンドスタチン ; 白血球阻害因子 (LIF) ; 毛様体神経栄養性因子 ; カルディオトロフィンおよびオンコスタチン (オンコスタチンMを含む)。

【0086】

本発明の方法はまた、細胞培養における産生を可能にする多数のタンパク質のいずれかの発現を増加するために使用され得る。例示的なタンパク質としては、インスリン、エリスロポエチン (EPO)、組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA)、成長ホルモンおよびVIII因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

所定のサイトカインまたは他のタンパク質の増加した発現が一旦達成されると、それにより産生されるサイトカインまたは他のタンパク質が、細胞培養から精製される。このような精製に適切な例示的手順としては、以下が挙げられる：抗体アフィニティーカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカまたはカチオン交換樹脂（例えば、DEAE）におけるクロマトグラフィー；等電点電気泳動；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；およびゲル濾過（例えば、Sephadex G-75）。タンパク質精製の種々の方法が、使用され得、そしてこのような方法は、当該分野で公知であり、そして例えば、Deutscher, 1990 ; Scopes, 1982に記載される。選択される精製工程は、例えば、使用された産生プロセスの性質および産生される特定のサイトカインまたはタンパク質の性質に依存する。

【0088】

サイトカインまたは他のタンパク質産生の「正常より高いレベル」は、PKRの過剰な発現を生じるのに有効な様式で細胞株を形質転換させるか、またはアポトーシス細胞死を阻害するのに有効な様式で細胞株を改変することのいずれも行わない場合の所定の細胞株についてのサイトカインまたは他のタンパク質産生レベルの、少なくとも200%または300%、好ましくは、500%以上を意味

する。

【0089】

本発明の方法において、ヒト細胞株が、PKR過剰発現およびアポトーシスの阻害の組み合わせ、またはアポトーシスの阻害単独により改変され、そしてサイトカインまたは他のタンパク質をそれぞれ10～1000倍増強するのに有効な様式で、培養される。

【0090】

(VI. PKR過剰発現、アポトーシスの阻害およびサイトカイン産生)

多数の因子が、細胞（例えば、ヒト細胞）におけるサイトカインの誘導および/または増強された発現に関係することが公知である。これらの因子としては、サイトカイン特異的転写調節因子および他のタンパク質特異的転写調節因子（例えば、インターフェロン調節因子（IRF-1、IRF-3およびIRF-7）、サイトカインレセプター、核因子（nuclear factor） κ B（NF- κ B）、アクチベータータンパク質-1（AP-1）、核因子（nuclear factor）IL-6（NF-IL6）、および特にPKR）が挙げられる。

【0091】

これらの因子のいずれかの発現または活性を増強することにより、1つ以上のサイトカインをコードする遺伝子の正常より高いレベルの発現を生じる。このような増強されたサイトカイン遺伝子の発現は、サイトカインのより効率がよくかつより低いコストでの産生を生じる。

【0092】

PKRが、サイトカインおよび他のタンパク質の発現を調節することが可能なタンパク質の例として、本明細書中で使用されるが；しかし、他のサイトカインおよび他のタンパク質を増強因子が、PKRの代わりに使用され得ることが理解され、例えば、1) タンパク質キナーゼC（PKC）インデューサー、TNF- α 、GM-CSF、EGFおよびPDGF、G-CSF、TGF、TNF- α またはTNF- β 、IL-1、IFN（IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ ）またはケモカイン（IL-8、マクロファージ炎症タンパク質 [MIP-1aおよび

びMIP-1b] および単球遊走 (chemotactice) タンパク質 [MCP]); 2) 他の細胞シグナル伝達因子 (例えば、PMA、カルシウムイオンフォア、酪酸ナトリウムまたはエンドトキシン); 3) ポリI:C、二本鎖RNAまたはウイルスアナログ; 4) 熱ショックまたは病原体感染 (ウイルスを含む) を含む、PKRを活性化し得る細胞性ストレスシグナル) は、活性化されたPKRおよび種々のサイトカインを過剰産生する。

【0093】

ヒト細胞におけるPKRの発現を増加することにより、サイトカイン産生が、増加され得る。従って、正常よりも高い構成的レベルのPKRを発現する動物細胞培養またはPKR発現が正常レベルよりも高いように誘導され得る動物細胞培養は、サイトカインの産生に有用である。

【0094】

所定のサイトカインを産生するために使用される細胞は、任意の哺乳動物供給源由来のPKR (例えば、ウサギ網状赤血球、種々のマウス組織、またはヒト末梢血単核細胞にて通常は見出されるPKR) を、過剰発現し得る。好ましくは、マウスp65キナーゼ、そして最も好ましくはヒトp68キナーゼが、それぞれ対応するマウス細胞培養またはヒト細胞培養において、過剰発現される。

【0095】

いくつかの場合において、過剰発現されるPKRは、PKRのアナログであり、例えば、サイトカインおよび他のタンパク質の転写のdsRNA活性化 (通常は、ネイティブのPKRタンパク質をコードする遺伝子の改変により得られる) を媒介し得る、非天然タンパク質キナーゼである。PKRを過剰発現し得るヒト細胞は、当該分野で周知である、かなり多数の方法により得られ得るか、または商業的供給源から得られ得る。

【0096】

PKR過剰発現細胞を得るための例示的方法としては、正常よりも高いPKRレベルを発現する細胞についての選択、プロモーターの制御下でPKRをコードする発現ベクターでのトランスフェクション、または正常なレベルを超えるPKR発現の増加を生じる他の方法が、挙げられる。

【0097】

このような発現ベクターにおける使用に適切なプロモーターとしては、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターの両方が挙げられ、その例としては、CMVプロモーター、およびメタロチオネインプロモーターが挙げられる。

【0098】

トランスフェクションは、以前に記載されたように実行され、そしてトランスフェクタントは、PKRの過剰発現について選択される。

【0099】

PKRの過剰発現により、正常よりも高いレベルのPKR活性が意図される。このような「正常な」PKRの活性または発現は、一般的に、PKRをコードするベクターでトランスフェクトされておらず、刺激（誘導または刺激（prime））されておらず、そして感染していない、所定の型の細胞について観察される、PKRの活性または発現の範囲として報告される。所定の型の細胞についての正常なPKR活性の範囲が、培養条件にいくらか依存して変化し得ることが、理解される。

【0100】

正常よりも高いPKR発現は、正常なPKRレベルの少なくとも150%、好ましくは少なくとも200%もしくは300%、そして最も好ましくは500%以上を意味する。PKR過剰発現細胞培養は、その培養物を単離もしくは調製するために使用される特定の方法に依存して、PKR過剰発現について構成的であってもよいし、またはPKR過剰発現について誘導性であってもよい。

【0101】

好ましくは、そのPKR過剰発現細胞株は、サイトカイン誘導に利用可能なPKRのレベルを調節するために、PKR過剰発現について誘導性である。

【0102】

同様に、好ましくは、その細胞培養物は、最適なサイトカイン誘導についてPKR発現と組み合わせてアポトーシスプロセスを調節するために、アポトーシスプロセスを妨げるタンパク質の過剰発現についてかまたはアポトーシスプロセスを促進するタンパク質の改変形態の発現について、誘導性である。

【0103】

P K Rおよびアポトーシス関連タンパク質の活性は、当該分野で公知の方法のいずれかにより決定され得る。P K R発現についての例示的アッセイとしては、自己リン酸化アッセイ、e I F 2 α についてのアッセイ、ウェスタンブロット、およびP K R mRNAについてのR T - P C R（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）が挙げられる。同様に、アポトーシス関連タンパク質の発現は、ウェスタンブロット、およびR T - P C Rにより決定され得る。

【0104】

アポトーシスを阻害する様式で改変された、既知の多数の細胞型のいずれかが、P K R過剰発現細胞株を生成するための親株として有用である。

【0105】

既知の多数の細胞培養物のいずれかが、P K R過剰産生細胞培養物を生成するための親株として有用である。サイトカインを通常産生し得る任意の細胞が、上記のように、親株として適切である。しかし、所定のサイトカインまたは目的のタンパク質を産生し得る任意の細胞株が、本発明の方法において使用され得る。サイトカインまたは他のタンパク質を産生することができるヒト細胞株が、当該分野で周知のかなり多くの方法（一次細胞株の単離を含む）により得られ得るか、またはこのような細胞株は、商業的供給源から得られ得る。ほとんどの場合において、所定のサイトカインまたは他のタンパク質を産生し得る細胞が、任意の適切な培地で培養される。

【0106】

いくつかの場合において、さらなる工程、特にP K R発現細胞の刺激が、ヒト細胞によるP K R発現を増強するために採られる。このような刺激としては、刺激因子、例えば、1) G - C S F、E G F、T N F - α もしくはT N F - β 、I L - 1、インターフェロン（I F N - α 、I F N - β 、I F N - γ を含む）またはケモカイン（I L - 8を含む）、マクロファージ炎症性タンパク質（M I P - 1 aおよびM I P - 1 bを含む）および単球遊走タンパク質（monocyte chemotactic protein）（M C P）；2）他の細胞シグナル伝達因子（例えば、ホルボールミリスレートアセテート（P M A）、カルシ

ウムイオノフォア、酪酸ナトリウムまたはエンドスタチン) ; ポリIC、二本鎖RNAまたはウイルスアナログ; 4) PKRを活性化し得る細胞性ストレスシグナル(熱ショックまたはウイルスを含む病原体感染を含む)での処理が挙げられ得る。

【0107】

このような処理としては、細胞培養物に殺菌誘導物質または非殺菌誘導物質を添加することが挙げられ得る。好ましくは、この誘導物質は、非殺菌誘導物質、例えば、ポリICまたはポリrICである。

【0108】

(VII. サイトカインまたは他のタンパク質の評価)

アポトーシスを阻害するに有効な様式で処理された、PKR過剰発現細胞株による目的のサイトカインもしくは他のタンパク質の発現を評価するために、タンパク質レベル、RNAレベルでかまたは発現されている個々のサイトカインもしくは他のタンパク質に対して独特の機能的バイオアッセイの使用により、アッセイが実行され得る。

【0109】

本発明を実行するために、PKR遺伝子でトランスフェクトされた細胞株、およびPKR遺伝子とBclXL遺伝子との両方でトランスフェクトされた細胞株が、実施例3に詳述されるように、ポリICおよびセンダイウイルスdsRNAの両方を用いて、サイトカイン誘導の条件下で細胞生存能力について試験された。これらの研究において、「6A」細胞が、PKR遺伝子とBclXL遺伝子との両方でトランスフェクトされ; 「A9」細胞が、PKR遺伝子のみでトランスフェクトされ; そして「WT (野生型)」が、トランスフェクトされなかった。これらの細胞は、ポリICまたはセンダイウイルスRNAのいずれかでのサイトカイン誘導の後に、PKR過剰産生(これは、6A細胞およびA9細胞において生じる)の条件下で試験された。図2Aおよび2Bにおけるデータから理解されるように、PKR過剰産生細胞においてアポトーシスを阻害することは、サイトカイン誘導条件下で細胞生存能力を有意に増加し、そしてWT細胞(PKR産生しない)を超えて生存能力を増強さえした。

【0110】

関連する実施形態（これもまた、実施例3に詳述される）において、IFN- α の発現レベルが、この同じ3つの細胞株において、これもまた、センダイウイルスまたはポリICのいずれかでのPKR過剰産生条件およびサイトカイン誘導条件下で、測定された。図3Aにおけるデータから、PKR過剰産生（WTに対して6AおよびA9）は、サイトカイン産生を有意に誘導すること、およびサイトカイン産生における数倍のさらなる増強が、サイトカイン誘導条件の間にアポトーシスを阻害することにより観察された（6A対A9）ことが理解される。図3Bにおける同様の結果もまた、サイトカイン誘導における有意な増強がPKR過剰産生により達成された（WTに対して6AおよびA9）ことを示す。A9細胞対6A細胞において観察される高い方のレベルのサイトカイン産生は、一時的効果を反映し得、そして細胞生存期間の間のサイトカイン産生の全体的量は考慮しない。

【0111】

特定のサイトカインもしくは他のタンパク質についてのイムノアッセイが、当業者により慣用的に使用される手順を用いて実行され得る。このようなイムノアッセイは、目的のサイトカインもしくは他のタンパク質の発現を定性的および定量的に分析するために使用され得る。

【0112】

一般に、その目的のサイトカインもしくは他のタンパク質の精製形態は、天然の供給源から得られるかまたはトランスフェクトされた細胞において組換え産生されるかのいずれかであり、そして、タンパク質精製についての標準的技術を使用して精製される。次いで、その精製タンパク質が、発現されるタンパク質に特異的なモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体のいずれかを産生するために使用され、そしてこれら抗体は、種々のイムノアッセイにおいて使用され得る（例えば、HarlowおよびLane、1998を参照のこと）。例示的アッセイとしては、ELISA、競合的イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、間接的免疫蛍光アッセイなどが挙げられる。

【0113】

一般に、市販のキットが、公知のサイトカインもしくは他のタンパク質の発現レベルの定量的イムノアッセイに使用され得る。

【0114】

さらに、真核生物タンパク質の機能的発現は、周知である。例示的方法は、Sambrookら、1989（本明細書中に明示的に参考として援用される）に記載される。簡潔には、細胞が、適切な発現ベクターでトランスフェクトされ、そして培養培地中またはトランスフェクトされた細胞の表面上に目的のサイトカインまたは他のタンパク質の発現を生じるに有効な条件下で培養される。

【0115】

特定の例が上記に記載されているが、多くの改変が可能であること、およびこの例は、本発明を限定すると特定されない限り、例示のみを目的として提供され、本発明を限定しないことが、当業者には明らかである。

【0116】

本明細書中に引用される特許および参考文献すべては、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0117】

（実施例1）

（プラスミドpEF-FLAG-Bcl-X_LおよびプラスミドpcDNA-FLAG-PKRの調製）

（1. pEF-FLAG-Bcl-X_Lの調製）

図1A中のpEF-FLAG-Bcl-X_Lベクター（Huangら、1997）は、強力な伸長因子1 α （EF-1 α ）プロモーターに作動可能に連結された抗アポトーシスBcl-X_Lタンパク質をコードする全長cDNAを含む。このベクターのさらなる顕著な特徴は、高レベルのBcl-X_Lを発現する細胞株の選択を容易にするためにBcl-X_Lタンパク質に付加された、N末端FLAGエピトープ（Hoppら、1988）である。

【0118】

このベクターはまた、i) mRNAの安定性を増強するためのポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列；ii) エピソーム性複製および簡単なベクターレ

スキューのためのSV40起点；iii) E. coliにおける選択および維持のためのアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点；ならびにiv) Bcl-X_LおよびPKRのトランスフェクション後にそのプラスミドを含む真核生物細胞の選択および同定を可能にするための、プロマイシン耐性マーカー (Puro) を含む。

【0119】

(2. pcDNA-FLAG-PKRの調製)

図1B中のpcDNA-FLAG-PKRベクターは、配列MDYKDDDDKをコードするN末端FLAGタグ (Hoppら、1988) を含むようにポリメラーゼ連鎖反応により改変されそして真核生物発現ベクターpcDNA3 (Invitrogen) 中に挿入された全長PKR分子 (551アミノ酸；Meursら、1990；GenBank登録番号NM002759) をコードするcDNAを含み、そのFLAG-PKRコード配列がCMVプロモーターの制御下で発現されるようになった。

【0120】

このベクター (pcDNA-FLAG-PKRと称する) は、i) 高レベルmRNA発現のためのヒトCMVの極初期遺伝子由来のプロモーター配列；ii) mRNAの安定性を増強するためのウシ成長ホルモン (BGH) 遺伝子由来のポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列、iii) エピソーム性複製および簡単なベクターレスキューのための、SV40起点；iv) E. coliにおける選択および維持のためのアンピシリン耐性遺伝子およびColE1起点；ならびにv) トランスフェクション後にそのプラスミドを含む真核生物細胞の選択および同定を可能にするための、G418耐性マーカー (Neo) を含む、PKR転写に適切な種々の特徴を含む。

【0121】

第2のPKRベクター (pTRE-PKRと称する) を、Clontechから得られたpTREプラスミドの遺伝子挿入部位に同じPKR cDNAを挿入することにより、調製した。このpTREプラスミドは、第1の記載されたPKRベクターを作製する際に使用されるFLAGと類似するが、挿入される遺伝子

を制御するために使用されるCMVプロモーターの上流にテトラサイクリン応答性エレメントを含む。実施例3に報告される研究において、TRE機能は利用されなかった。それ故、形質転換された細胞におけるこの2つのPKRベクターの作用は、本質的に同一であることが予測される。

【0122】

(実施例2)

(PKR過剰産生Namalwa細胞株6AおよびA9の調製)

(1. 細胞株6Aの調製)

ヒトBリンパ芽球(lymphoblastoid cell)株であるNamalwa(WT)を、プラスミドpEF-FLAG-Bcl-X_LおよびpcDNA-FLAG-PKRで連続してトランスフェクトした。このトランスフェクトされた細胞株は、6Aと呼ばれる。

【0123】

対数増殖中の 4×10^6 個のNamalwa細胞を、 $800 \mu\text{F}$ 、 300V に設定したGene Pulser装置(Bio-Rad)を使用してDMEM/F12(+10% FBS)中のpEF-FLAG-Bcl-X_Lプラスミド $15 \mu\text{g}$ を用いてエレクトロポレーションすることによって、安定なトランスフェクタントを得た。安定な形質転換体の大量の集団を、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ プロマイシン(Gibco-BRL)での3~4週間の選択により得、そして以下のようにフローサイトメトリーによりBcl-X_L発現についてスクリーニングした。この大量のトランスフェクタントを洗浄し、アセトンを用いて透過性にし、その後、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗FLAG M2モノクローナル抗体(ABI)で染色し、次いでフィコエリトリン結合体化ヤギ抗マウスIgG($1 \mu\text{g}/\text{ml}$; Becton-Dickinson)で染色した。細胞を、FACSscanにおいて分析し、生細胞および死細胞を、その前方光散乱特性および側方光散乱特性に基づいて識別し、そしてBcl-X_L発現細胞を、その蛍光強度のレベルにより識別した。次いで、高レベルBcl-X_L発現形質転換体(Namalwa-Bcl-X_L)を、pcDNA-FLAG-PKRでトランスフェクトした。

【0124】

高レベルのBcl-X_Lを発現する安定なトランスフェクタントを、800 μ F、300Vに設定したGene Pulser装置(Bio-Rad)を使用してDMEM/F12(+10% FBS)中のpcDNA-FLAG-PKRプラスミド15 μ gを用いて対数増殖中の 4×10^6 個のNamalwa-Bcl-X_L細胞をエレクトロポレーションすることによって、得た。安定な形質転換体の大量の集団を、2 μ g/mlのジェネティシン(G418、Gibco-BRL)での3~4週間の選択により得た。その後、クローン性の株を、限界希釈クローニングにより得、そしてウェスタンブロット分析によりBcl-X_LおよびPKRの発現について分析した(Huangら、1997)。このタンパク質を、2 μ g/mlの抗FLAG M2抗体を使用し、その後、ヤギ抗マウスIgG-ペルオキシダーゼ結合体およびECL検出(Amersham)を使用して同定した。

【0125】

(2. 細胞株A9の調製)

高レベルのPKRを発現する安定なトランスフェクタントを、800 μ F、300Vに設定したGene Pulser装置(Bio-Rad)を使用してDMEM/F12(+10% FBS)中のpTRE-PKRプラスミド15 μ gを用いて対数増殖中の 4×10^6 個のNamalwa細胞をエレクトロポレーションすることによって、得た。安定な形質転換体の大量の集団を、2 μ g/mlのジェネティシン(G418、Gibco-BRL)での3~4週間の選択により得た。その後、クローン性の株を、限界希釈クローニングにより得、そしてウェスタンブロット分析によりPKR発現について分析した(Huangら、1997)。

【0126】

(実施例3)

(Bcl-X_LおよびPKRを過剰産生するNamalwa細胞株の特徴付け)

(1. 増加した細胞生存能力)

野生型Namalwa細胞(WT)および実施例2からのA9細胞および6A

細胞を、PKR過剰産生の条件およびサイトカイン誘導の条件下で、培養における細胞生存能力について試験した。詳細には、PKRおよびBcl-X_Lで二重トランスフェクトされたNamalwa細胞(6A細胞株)、PKRでトランスフェクトされたNamalwa細胞(A9細胞株)および親Namalwa細胞(WT)を、10% FBSを補充したDMEM/F12培地中 2.5×10^5 細胞/mlで培養した。その細胞を、20mM PMA(刺激因子(primer))で20時間処理し、その後、200 μ g/mlのポリr(I):ポリr(C)および10 μ g/mlのDEAE Dextran(ポリIC誘導)で72時間の処理か、または200HAU/ 1×10^6 細胞のセンダイウイルスで48時間の処理のいずれかを行った。処理後、細胞生存能力を、FACSscanにおけるフローサイトメトリーにより評価した。

【0127】

図2Aおよび2Bは、3つすべての細胞株のポリIC誘導が、個々の示された時間で、その細胞のセンダイウイルス誘導よりも有意に低い細胞生存能力を生じたことを示す。ポリIC誘導を用いると、6A細胞のうちの54%、A9細胞のうちの40%、そしてWT細胞のうちの51%が生存可能なままであったが、一方、センダイウイルス誘導を用いると、6A細胞のうちの87%、A9細胞のうちの66%およびWT細胞のうちの63%が生存可能なままであった。

【0128】

両方の誘導プロトコルを用いると、抗アポトーシスタンパク質Bcl-X_LおよびPKRの両方を過剰発現する6A細胞株は、PKRを過剰発現するがアポトーシスについて阻害されないA9細胞株よりも高い生存能力を示した。

【0129】

(2. インターフェロ α の増加した発現)

IFN- α 産生のレベルもまた、両方ともPKR過剰産生条件下でのポリICおよびセンダイウイルスによるサイトカイン誘導の後に、この3つの細胞株において分析した。培養上清を収集し、そしてELISAキットの供給者(R&D Systems)により提供される手順に従って、ELISAによりIFN- α レベルについて分析した。結果を、図3Aおよび3Bに示し、上記に議論してい

る。

【0130】

上記から、本発明の種々の目的および特徴がどのようにして満たされるかが、理解され得る。当業者はここで、本発明のこの広い教示が、種々の形態で実行され得ることを、上記の記載から理解し得る。従って、本発明がその特定の実施形態および実施例と共に記載されているが、本発明の真の範囲はそうのように限定されるべきではない。種々の変化および改変が、添付の特許請求の範囲により規定されるような、本発明の範囲から逸脱することなくなされ得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 Aおよび1 Bは、本発明の実施において有用である、ベクター、p E F - F L A G - B c l - X₁およびp c D N A - F l a g - P K Rをそれぞれ示す。

【図2】

図2 Aおよび2 Bは、それぞれセンダイウイルスおよびポリ I Cによるサイトカイン誘導後の、6 A細胞株、A 9細胞株およびW T細胞株の生存率を示す。

【図3】

図3 Aおよび3 Bは、それぞれセンダイウイルスおよびポリ I Cによる処理後の、6 A細胞株、A 9細胞株およびW T細胞株において産生されたI F N - α レベルを示す。

【図1】

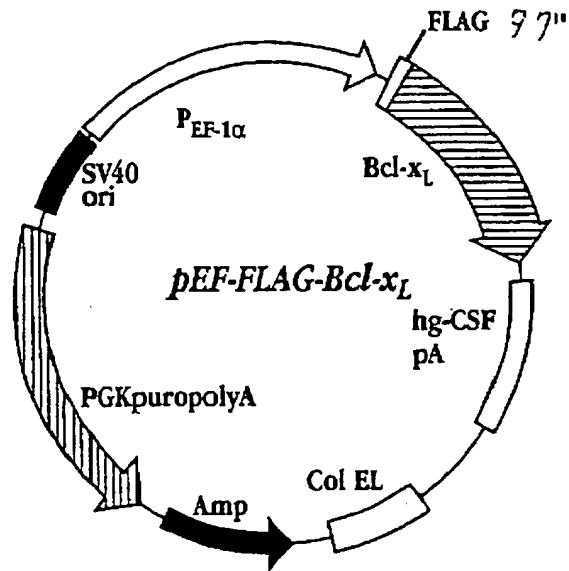


Fig. 1A

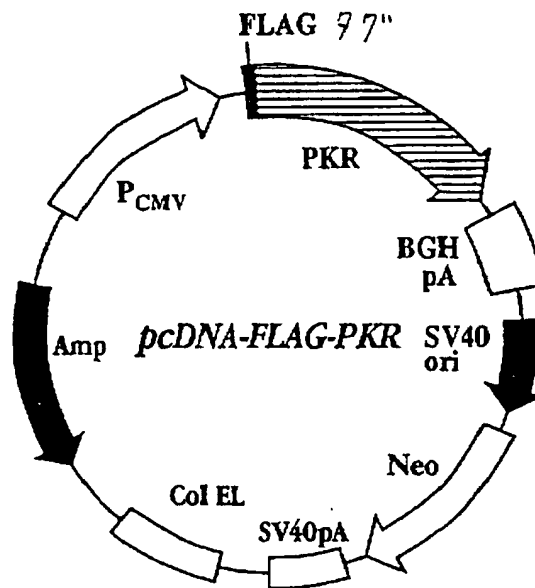
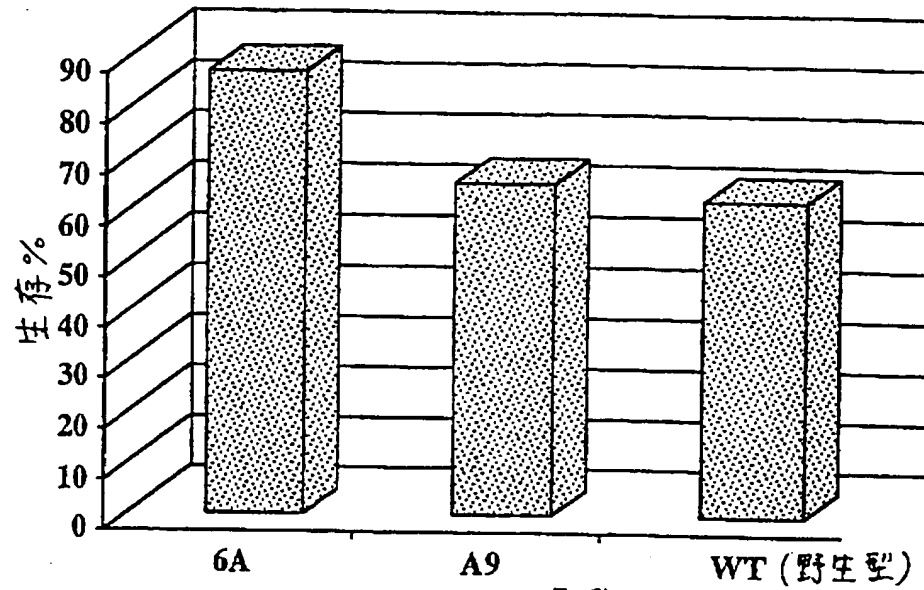
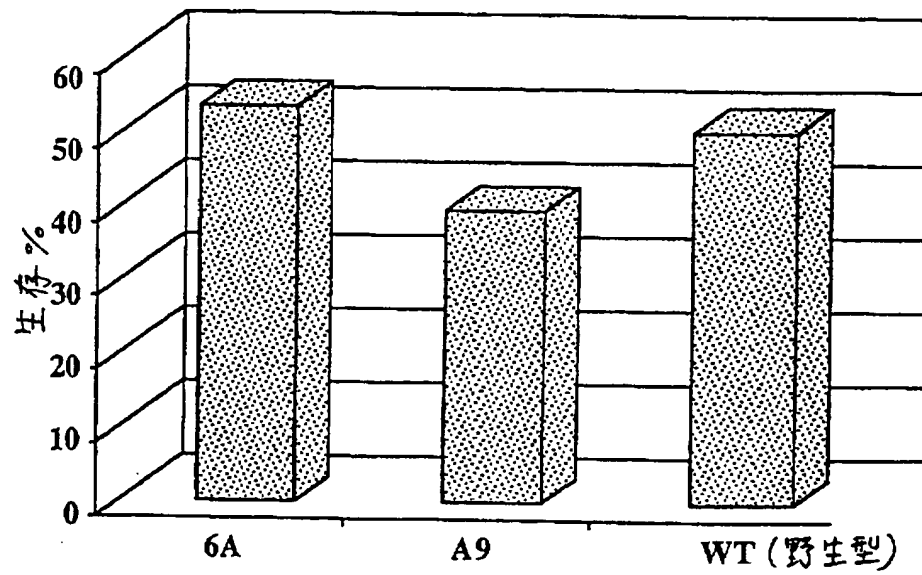
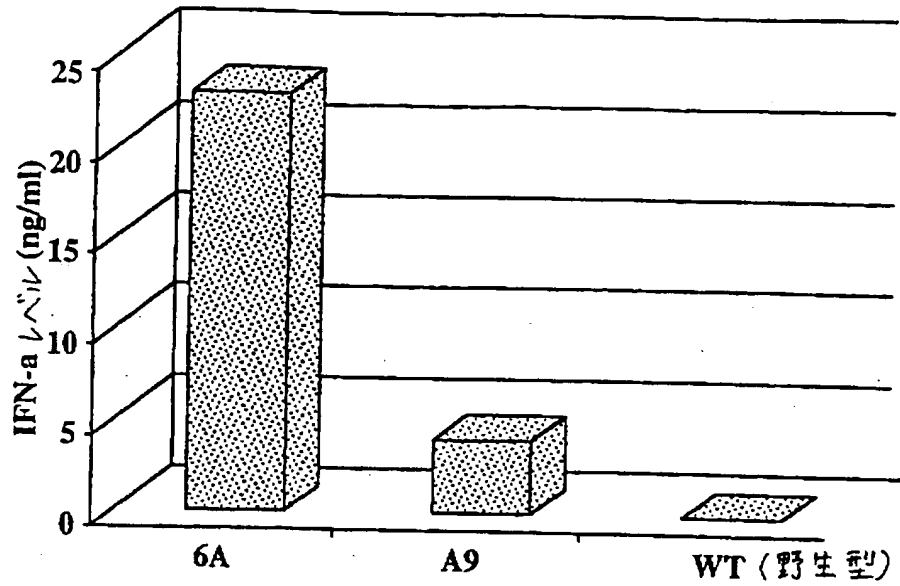
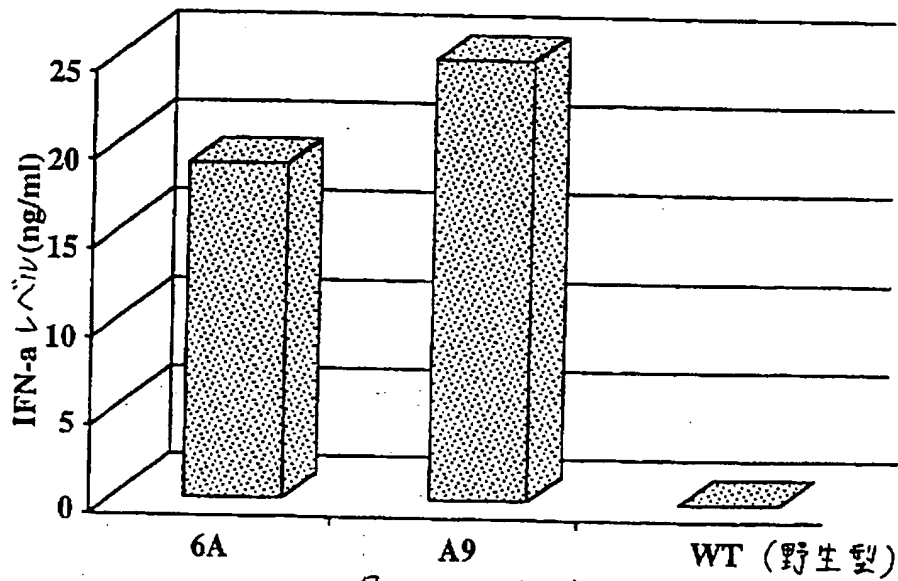


Fig. 1B

【図2】

クローンの名称
Fig. 2Aクローンの名称
Fig. 2B

【図3】

クローンの名称
Fig. 3Aクローンの名称
Fig. 3B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Patent Application No.
 PCT/US 00/24657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/12 C07K14/555		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 08324 A (UNIV CALIFORNIA) 6 March 1997 (1997-03-06) cited in the application abstract page 3, line 29 - page 4, line 2	1-12
Y	WO 98 00013 A (UNIV CALIFORNIA) 8 January 1998 (1998-01-08) abstract page 20, line 22 - line 28	1-12
Y	WO 97 08292 A (UNIV CALIFORNIA) 6 March 1997 (1997-03-06) page 4, line 6 - line 13 page 7, line 10 - line 16	1-12
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 February 2001		19/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sprinks, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. l. Application No.
PCT/US 00/24657

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BALACHANDRAN SIDDHARTH ET AL: "Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 17, no. 23, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 6888-6902, XP002159409 ISSN: 0261-4189 abstract	1-12
Y	GIL JESUS ET AL: "Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 19, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 4653-4663, XP002159410 ISSN: 0270-7306 abstract	1-12
Y	IMAIZUMI KAZUNORI ET AL: "The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 12, 19 March 1999 (1999-03-19), pages 7975-7981, XP002156341 ISSN: 0021-9258 the whole document	3,4,11, 12
Y	HAN D K M ET AL: "MRIT, A NOVEL DEATH-EFFECTOR DOMAIN-CONTAINING PROTEIN, INTERACTS WITH CASPASES AND BCLXL AND INITIATES CELL DEATH" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 94, no. 21, 14 October 1997 (1997-10-14), pages 11333-11338, XP002071904 ISSN: 0027-8424 the whole document	3,4,11, 12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Appl. Application No
PCT/US 00/24657

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARLAND JOHN M ET AL: "Energy metabolism during apoptosis: bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 8, 1997, pages 4680-4688, XP002159411 ISSN: 0021-9258 the whole document	3,4,11, 12
Y	CHITTENDEN T ET AL: "INDUCTION OF APOPTOSIS BY THE BCL-2 HOMOLOGUE BAK" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 374, 20 April 1995 (1995-04-20), pages 733-736, XP002910967 ISSN: 0028-0836 the whole document	3,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(Information on patent family members)

Int. Serial Application No.

PCT/US 00/24657

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9708324 A	06-03-1997	AU 6857696 A	19-03-1997
		AU 707130 B	01-07-1999
		AU 6860896 A	19-03-1997
		BR 9610550 A	06-07-1999
		CA 2229163 A	06-03-1997
		CA 2229405 A	06-03-1997
		CN 1200148 A	25-11-1998
		EP 0846174 A	10-06-1998
		EP 0846160 A	10-06-1998
		JP 11511324 T	05-10-1999
		JP 11514344 T	07-12-1999
		WO 9708292 A	06-03-1997
		US 6159712 A	12-12-2000
WO 9800013 A	08-01-1998	AU 3583797 A	21-01-1998
		US 5976800 A	02-11-1999
WO 9708292 A	06-03-1997	AU 6857696 A	19-03-1997
		AU 707130 B	01-07-1999
		AU 6860896 A	19-03-1997
		BR 9610550 A	06-07-1999
		CA 2229163 A	06-03-1997
		CA 2229405 A	06-03-1997
		CN 1200148 A	25-11-1998
		EP 0846174 A	10-06-1998
		EP 0846160 A	10-06-1998
		JP 11511324 T	05-10-1999
		JP 11514344 T	07-12-1999
		WO 9708324 A	06-03-1997
		US 6159712 A	12-12-2000

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ブラウニング, ローラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94513,
ブレントウッド, アウトリガー サー
クル 925

(72)発明者 キエファー, マイケル シー,
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94517,
クレイトン, ライト コート 401

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA10 BA21 CA04 DA02
EA04 FA02 GA14 HA01 HA15
4B064 AG02 CA10 CA19 CC24